烯啶虫胺、毒死蜱和高效氯氰菊酯对烟粉虱地中海隐种 *hsp*70 mRNA 的诱导表达

郭雅洁, 梁 沛*, 高希武
(中国农业大学昆虫学系, 北京 100193)

摘要: 为深入理解杀虫剂胁迫对烟粉虱 *Bemisia tabaci* 适应逆境能力的影响, 本研究运用实时荧光定量 PCR 技术测定了 LC_{25}, LC_{50} 和 LC_{75} 3 种浓度的烯啶虫胺、毒死蜱和高效氯氰菊酯分别处理对烟粉虱地中海隐种 *B. tabaci* Mediterranean 成虫体内热激蛋白 *hsp*70 表达水平的影响。结果表明: 在低温(15℃)条件下, LC_{50} 和 LC_{75} 的烯啶虫胺、毒死蜱、高效氯氰菊酯可显著诱导烟粉虱地中海隐种 *hsp*70 的表达量增加, 此后随时间延长 *hsp*70 表达量逐渐下降, 到 72 h 时恢复到对照水平, 但 LC_{25} 的 3 种杀虫剂对 *hsp*70 的表达无明显影响; 在常温(25℃)下, 较高浓度(LC_{50} 和 LC_{75})的烯啶虫胺、毒死蜱和高效氯氰菊酯处理 24 h 同样可促进 *hsp*70 表达量的增加, 然后 *hsp*70 表达量逐渐下降, 到 72 h 时恢复至正常水平, 但低浓度(LC_{25})的 3 种药剂处理后 *hsp*70 表达量随时间延长而增加, 到 72 h时达到最高; 在高温(32℃)条件下, LC_{25} 和 LC_{50} 的烯啶虫胺、毒死蜱和高效氯氰菊酯处理 24 h 可显著增强 *hsp*70 的表达水平, 此后随时间的延长 *hsp*70 表达恢复至正常水平。杀虫药剂诱导的 hsp70 表达量增加增强了烟粉虱地中海隐种对杀虫药剂和高温的耐受能力, 这可能是导致其在我国快速扩张的原因之一。

关键词: 烟粉虱地中海隐种; 杀虫剂; 热激蛋白; *hsp*70; mRNA 表达量
中图分类号: Q965.9 **文献标识码**: A **文章编号**: 0454-6296(2013)01-0029-10

Induced expression of *hsp*70 mRNA by nitenpyram, chlorpyrifos and beta-cypermethrin in *Bemisia tabaci* Mediterranean (Hemiptera: Aleyrodidae)

GUO Ya-Jie, LIANG Pei*, GAO Xi-Wu (Department of Entomology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract: To understand the effects of insecticides on the adaption of the white fly *Bemisia tabaci* Mediterranean to stress environment, the expression of the heat shock protein gene *hsp*70 in this whitefly was investigated using real-time quantitative PCR after treatment with LC_{25}, LC_{50} and LC_{75} of nitenpyram, chlorpyrifos and beta-cypermethrin, respectively, at different temperatures. The results showed that at the lower temperature (15℃) the treatments of the three insecticides at LC_{50} and LC_{75} for 24 h significantly induced an increase in the expression level of *hsp*70, and then the expression was decreased gradually and showed no difference from the untreated control at 72 h after treatment; the three insecticides at LC_{25}, however, showed no effect on the expression of *hsp*70. At room temperature (25℃), nitenpyram, chlorpyrifos and beta-cypermethrin at LC_{50} and LC_{75} induced the expression of *hsp*70 significantly at 24 h after treatment, and then the expression levels were decreased gradually to the normal level at 72 h after treatment; the three insecticides at LC_{25}, however, induced an increased expression of *hsp*70 with the treatment time. At a higher temperature (32℃), nitenpyram, chlorpyrifos and cypermethrin at LC_{25} and LC_{50} significantly induced the expression of *hsp*70 at 24 h after treatment and the expression levels were then decreased and showed no difference from the control at 72 h after treatment. The high-level expression of hsp70 induced by insecticides enhances the tolerance of the whitefly to insecticides and high temperature, which may be one of the reasons that this whitefly expanded quickly in China.

Key words: *Bemisia tabaci* Mediterranean; insecticide; heat shock protein; *hsp*70; mRNA expression level

---

基金项目: 国家重点基础研究发展规划项目(2009CB119200)
作者简介: 郭雅洁, 女, 1987 年生, 山东莱阳人, 硕士研究生, 主要从事昆虫毒理学研究, E-mail: guo.yajie-2008@163.com
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: liangcau@sohu.com
收稿日期 Received: 2012-10-09; 接受日期 Accepted: 2012-12-21

烟粉虱地中海隐种 *Bemisia tabaci* Mediterranean［由 De Barro 等（2011）将原来的 Q，J，L，Sub-Saharan Africa 和 Silverleaf 生物型合并而成，本文指原 Q 生物型］，是世界性的农业和园艺重要害虫。烟粉虱地中海隐种最初仅在伊比利亚半岛发生，随后在日本、美国、墨西哥和危地马拉等许多国家和地区均有发现（Ueda *et al*.，2006；Brown，2007）。Bethke（2009）应用 mtDNA COI 对危地马拉的两个大型商业温室中蔬菜和一品红等观赏植物上的烟粉虱鉴定发现，过去一直猖獗的中东-小亚细亚 1 隐种［*B. tabaci* Middle East-Asia Minor 1，由 De Barro 等(2011)将原来的 B 和 B2 生物型合并而成，本文指原 B 生物型烟粉虱］已经被烟粉虱地中海隐种所取代。在我国，中东-小亚细亚 1 隐种一直是造成严重危害的优势种，但近年来也已被地中海隐种所取代，如 Teng 等(2010) 对采自我国 15 省的 22 个烟粉虱种群鉴定发现，其中 19 个种群中含有不同比例的地中海隐种，只有 3 个种群不含地中海隐种；陈冲等(2011)对采自湖北省 7 个市的烟粉虱种群鉴定结果表明，其中 6 个种群为地中海隐种，仅 1 个为中东-小亚细亚 1 隐种；史苹香等(2012)对采自上海 10 个代表性地区的 45 个烟粉虱种群鉴定发现，有 31 个种群为地中海隐种，且采自温室大棚的种群多为地中海隐种（占 87.0%）。而在北京和河北局部地区地中海隐种已经全部取代了中东-小亚细亚 1 隐种(潘慧鹏等，2010)。有研究认为，与中东-小亚细亚 1 隐种相比，地中海隐种具有更强的耐热性(Mahadav *et al*.，2009)，同时对新烟碱类杀虫药剂的抗性也更高（Luo *et al*.，2010)，这可能是地中海隐种迅速扩张、取代中东-小亚细亚 1 隐种的主要原因。已经明确，烟粉虱的耐热性与其热激蛋白的表达水平有着直接关系（Mahadav *et al*.，2009)，但有关杀虫剂诱导与烟粉虱热激蛋白表达水平的关系尚不明确。因此，深入理解杀虫剂对烟粉虱地中海隐种热激蛋白表达的影响可为进一步揭示其快速扩张机制提供实验证据。

热激蛋白（又称热休克蛋白）（heat shock proteins，hsps）是生物体遭受不利环境条件胁迫时迅速产生的一种抗逆蛋白，可帮助生物机体度过不利环境条件（Lindquist，1986；Zhao and Jones，2012)。根据蛋白分子量大小，hsps 主要分为 4 个家族，即 hsp90，hsp70 和 hsp60 家族及小分子 hsp 家族，其中对 hsp70 的研究最普遍（Parse and Lindquist，1994)。目前关于杀虫剂影响 hsps 表达的报道基本都是将 hsps 作为检测环境中农药污染的分子标记去研究（Yoshimi *et al*.，2002；Sharma *et al*.，2008；Langer-Jaesrich *et al*.，2010；Shashikumar and Rajini，2010)。而关于杀虫剂诱导 hsps 表达对害虫适应环境能力方面的研究则未见报到。本文主要研究了不同温度下烯啶虫胺、高效氯氰菊酯和毒死蜱 3 种作用方式不同的杀虫剂处理对烟粉虱地中海隐种 *hsp*70 mRNA 表达量影响的浓度、时间和温度效应，并对烟粉虱地中海隐种快速扩张的可能机制进行了讨论。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

烟粉虱地中海隐种于 2010 年 6 月下旬采自中国农业科学院蔬菜花卉研究所温室，以茄子 *Solanum melongena* L. 为寄主植物，室内继代饲养，温度 25 ± 2℃，相对湿度 50% ~ 70%，光周期 12L∶12D，未接触任何药剂。

1.2 供试药品及试剂

96.5% 烯啶虫胺原药购自江苏常隆化工有限公司；96.6% 高效氯氰菊酯原药购自江苏扬农化工股份有限公司；95.3% 毒死蜱原药购自江苏丰山集团有限公司。TRIzol Reagent 购自 Invitrogen 公司；Thermo Scientific Verso™ cDNA Synthesis Kit 购自 Thermo Scientific 公司；SYBR® *Premix Ex Taq*™ Ⅱ（Perfect Real Time）购自大连宝生物工程有限公司。所用杀虫剂分别以丙酮为溶剂配制成浓度为 50 g/L 的母液，置 4℃ 冰箱中保存备用。

1.3 生物测定方法

生物测定采用田玉安等(2012)改进的 100 mL 插口离心管琼脂保湿浸叶法。实验时，用 0.02% 的 Triton X-100 将烯啶虫胺、高效氯氰菊酯、毒死蜱 3 种药剂的母液分别稀释 6 个浓度(烯啶虫胺：100，50，25，12.5，6.25，3.125 mg/L；高效氯氰菊酯：4 000，2 000，1 000，500，250，125 mg/L；毒死蜱：8 000，4 000，2 000，1 000，500，250 mg/L)，取新鲜干净的茄子叶片用打孔器制备直径为 33 mm 的茄子叶盘浸入药液中 10 s 后，取出晾干并放入离心管盖内的琼脂凝胶（2.6%，w/v)表面，盖在离心管一端。接入烟粉虱地中海隐种成虫 30 ~ 50 头，每个浓度 4 个重复，以 0.02% 的 Triton X-100 处理的叶盘为对照。置于光照培养箱内饲养 72 h。饲养条件为：温度 25 ± 2℃，相对湿度 70%，光周期 12L∶

12D。用 POLO 软件处理数据，计算 3 种药剂 LC_{25}，LC_{50}和 LC_{75}值和毒力回归方程的斜率。

1.4　烯啶虫胺、高效氯氰菊酯和毒死蜱处理烟粉虱地中海隐种

预先配制 LC_{25}，LC_{50}和 LC_{75}烯啶虫胺 0.02% Triton X-100 水溶液，将茄子叶盘分别浸入其中 10 s 后取出，待室温晾干后放入离心管插口盖内的琼脂凝胶层上，盖上插口盖待用。将收集的烟粉虱地中海隐种成虫于 −20℃ 冰箱冷冻 5 min，将冻晕的试虫放入离心管中，另一端用黑棉布封口。每管 150 头左右，每个浓度 9 ~ 12 个离心管(根据药剂浓度大小适当调整处理管数)。同样经 −20℃ 冷冻 5 min 处理的烟粉虱用 0.02% Triton X-100 处理的叶盘饲养作为对照。将处理组和对照组置于 15℃，25℃和 32℃(LC75 处理组在 32℃ 下全部死亡，故 LC_{75}处理组只做了 15℃和 25℃两个处理)培养箱中饲养，分别于 24，48 和 72 h 后取不同温度、不同浓度处理的烟粉虱 1 ~ 2 管，同时取对照组试虫 1 管。剔除死虫，将存活个体收集于 1.5 mL 离心管内液氮速冻后置于 −80℃ 冰箱备用。高效氯氰菊酯和毒死蜱处理烟粉虱方法同上，实验设 3 次生物学重复。LC_{25}，LC_{50}和 LC_{75}的 3 种药剂处理 72 h 后，烟粉虱的死亡率与期望死亡率基本相符。

1.5　烟粉虱地中海隐种 *hsp*70 mRNA 表达量检测

参照 TRIzol Reagent 试剂盒方法提取不同处理的烟粉虱地中海隐种总 RNA，并利用 Thermo Scientific Verso™ cDNA Synthesis Kit 试剂盒合成 cDNA。*hsp*70 mRNA 表达量检测的引物分别为：hsp70-F：5′-ACCCGCCGTTGGAATTGATC-3′ 和 hsp70-R：5′-GCTGGGAGTGGTGCGGTTTC-3′。以 *β-actin* 作为内参基因，定量PCR的上下游引物分别为 β-actin-F 5′-CTCGTGGATACCGCAAGATT-3′和 β-actin-R：5′-GTCATCACAATCGGAAACGA-3′。

荧光定量 PCR 检测使用大连宝生物工程有限公司的 SYBR® *Premix Ex Taq*™ Ⅱ (Perfect Real Time) 试剂盒进行。反应体系为 20 μL，其中 SYBR® *Premix Ex Taq*™ Ⅱ或 Ⅰ (2 ×) 10 μL，PCR 上下游引物(5 μmol/L)各 1.6 μL，ROX Reference Dye (50 ×) 0.4 μL，cDNA 模板 2.0 μL，ddH_2O 4.4 μL。反应条件：95℃预变性 30 s 后，95℃ 5 s，60℃ 30 s，40 个循环；溶解曲线为 95℃ 15 s，60℃ 1 min。以烟粉虱 *β-actin* 为内参计算 *hsp*70 mRNA 的相对表达量。

1.6　数据处理

采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$法 (Pfaffl, 2001) 计算不同处理组中烟粉虱地中海隐种 *hsp*70 mRNA 相对于对照组的表达量。同一温度条件下处理组与对照组烟粉虱地中海隐种 *hsp*70 相对表达水平差异用 *t* 检验；同一温度条件下不同药剂浓度及同一浓度处理不同时间组基因表达量差异采用单因素方差分析(One-way ANOVA，LSD 检测)。以上数据分析均采用统计软件 SPSS 进行(SPSS 17.0，SPSS Inc.，USA)。

2　结果与分析

2.1　3 种杀虫剂对烟粉虱地中海隐种的生物测定结果

通过生物测定，计算得到的烯啶虫胺、毒死蜱和高效氯氰菊酯 3 种药剂对烟粉虱地中海隐种的 LC_{25}，LC_{50}和 LC_{75}(表 1)。3 种药剂对烟粉虱地中海隐种 *hsp*70 表达水平的影响即分别以表 1 所列 3 种不同浓度在相应温度下处理不同时间进行。

表 1　3 种杀虫剂对烟粉虱地中海隐种成虫的毒力

Table 1　Toxicity of three insecticides to adults of *Bemisia tabaci* Mediterranean

杀虫剂 Insecticides	斜率 Slope ± *SE*	LC_{25} (CI_{95})[a] (mg/L)	LC_{50} (CI_{95}) (mg/L)	LC_{75} (CI_{95}) (mg/L)
烯啶虫胺 Nitenpyram	2.4 ± 0.2	8.3(4.6 − 11.0)	13.1(9.3 − 16.1)	20.5(16.7 − 26.5)
毒死蜱 Chlorpyrifos	2.5 ± 0.3	1 359.7(1 110.9 − 1 589.9)	2 119.1(1 831.2 − 2 447.6)	3 302.6(2 833.2 − 4 014.4)
高效氯氰菊酯 Beta-cypermethrin	2.2 ± 0.2	583.9(435.8 − 721.2)	949.2(773.7 − 1 154.5)	1 542.6(1 260.7 − 2 013.5)

[a] CI_{95} 即 95% 的置信限 CI_{95} = 95% confidence interval.

2.2 15℃下不同浓度的 3 种杀虫剂处理对烟粉虱地中海隐种 *hsp*70 表达量的影响

在 15℃下处理后 24 h，烯啶虫胺 LC_{50}和 LC_{75}处理组烟粉虱地中海隐种 *hsp*70 表达量分别是对照组的 2.03 倍和 2.51 倍，显著高于对照组($P<0.05$)；处理后 48 h，烯啶虫胺 LC_{50}和 LC_{75}处理组烟粉虱地中海隐种 *hsp*70 表达量分别是对照的 1.47 倍和 1.55倍，也显著高于对照组($P<0.05$)；至处理后 72 h，LC_{50}和 LC_{75}的烯啶虫胺处理组与对照无显著差异。LC_{25}的烯啶虫胺处理不同时间后烟粉虱地中海隐种 *hsp*70 表达量与对照相比均无明显变化(图 1：A)。

毒死蜱 LC_{50}与 LC_{75}处理后 24 h，烟粉虱地中海隐种 *hsp*70 表达量分别是对照组的 2.61 倍和 1.90 倍($P<0.05$)；处理后 48 h 时，LC_{50}处理组烟粉虱地中海隐种 *hsp*70 表达量为对照组的 1.88 倍($P<0.05$)；处理后 72 h，3 种浓度的毒死蜱对烟粉虱地中海隐种 *hsp*70 的表达量均无明显影响(图 1：B)。

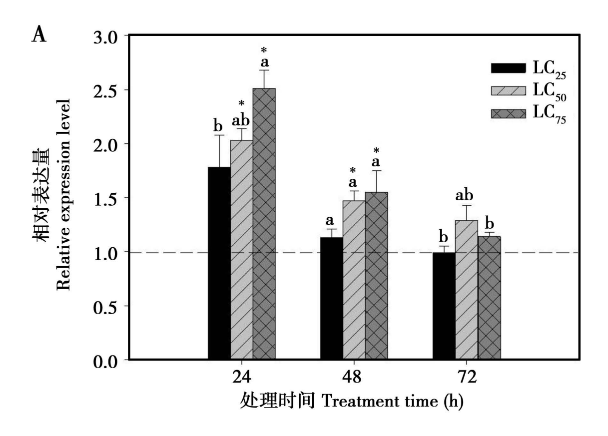
不同浓度的高效氯氰菊酯处理后 24 h，LC_{50}与 LC_{75}处理组烟粉虱地中海隐种 *hsp*70 的表达量分别是对照组的 1.96 倍和 2.41 倍($P<0.05$)；处理后 48 h，LC_{50}和 LC_{75}处理组烟粉虱地中海隐种 *hsp*70 表达量分别是对照组的 1.87 倍和 2.21 倍($P<0.05$)；而处理后 72 h，LC_{50}和 LC_{75}处理组 *hsp*70 表达量与对照组均无差异。LC_{25}的高效氯氰菊酯处理不同时间后 *hsp*70 的表达量均无显著变化(图 1：C)。

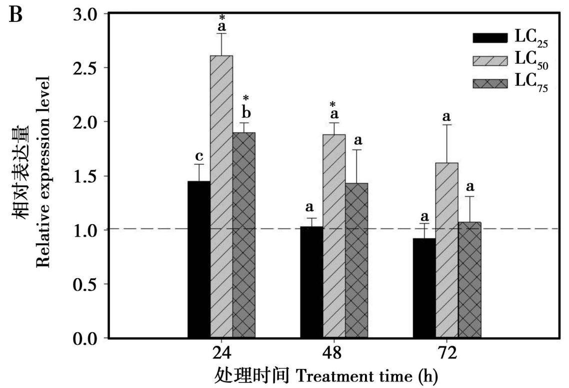
从处理的时间效应来看，LC_{25}的烯啶虫胺、毒死蜱和高效氯氰菊酯分别处理不同时间对 *hsp*70 表达量均无明显影响，而 LC_{50}和 LC_{75}的 3 种药剂处理后，随时间延长 *hsp*70 表达量基本呈下降趋势，具有一定的时间效应。

2.2 25℃下不同浓度的 3 种杀虫剂处理对烟粉虱地中海隐种 *hsp*70 表达量的影响

在 25℃下处理后 24 h，烯啶虫胺 LC_{75}处理组烟粉虱地中海隐种 *hsp*70 表达量为对照组的 1.91 倍($P<0.05$)；处理后 48 h，烯啶虫胺 LC_{25}，LC_{50}和 LC_{75}处理组的 *hsp*70 表达量均显著高于对照组($P<0.05$)，分别比对照增加了 63%，53% 和 64%；处理 72 h 后，LC_{25}和 LC_{50}的烯啶虫胺处理组 *hsp*70 表达量分别上升为对照组的 2.37 倍和 2.15 倍($P<0.05$)(图 2：A)。

毒死蜱处理后 24 h，LC_{50}与 LC_{75}处理组烟粉虱地中海隐种*hsp*70表达量均显著高于对照组($P<$





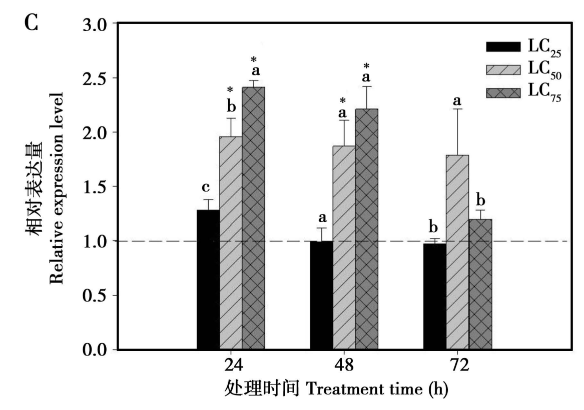


图 1 15℃下不同浓度烯啶虫胺(A)、毒死蜱(B)和高效氯氰菊酯(C)处理烟粉虱地中海隐种不同时间后 *hsp*70 mRNA 的相对表达量

Fig. 1 Relative expression level of *hsp*70 mRNA in *Bemisia tabaci* Mediterranean after treatment with nitenpyram (A), chlorpyrifos (B) and beta-cypermethrin (C) at LC_{25}, LC_{50} and LC_{75} for different time at 15℃

图中数据为 3 次生物学重复的平均值 ± 标准差；不同小写字母表示不同浓度的药剂处理相同时间后 *hsp*70 表达量存在显著性差异(ANOVA, $P<0.05$)；柱上星号表示该处理组与对照组差异显著(*t*-检验，$P<0.05$)。Y = 1.0 的虚线表示对照组 *hsp*70 的表达量；图 2 同。Data are shown as means of three replicates ± *SD*, and those at the same time point followed by different small letters are significantly different among treatments with different concentrations of an insecticide (ANOVA, $P<0.05$). The asterisk above bars indicates significance difference between treatment and the corresponding control (*t*-test, $P<0.05$). The expression level of *hsp*70 in the control group is marked with a dash line at Y = 1.0. The same for Fig. 2.

0.05)，分别比对照组增加了 93% 和 78%；处理后 48 h，LC_{50}与 LC_{75}处理组 *hsp*70 表达量分别比对照组增加了 58% 和 40%（$P<0.05$）；处理后 72 h，仅 LC_{25}处理组的表达量与对照组相比增加了 32%（$P<0.05$）(图2：B)。

高效氯氰菊酯处理后 24 h，LC_{50}与 LC_{75}处理组烟粉虱地中海隐种 *hsp*70 表达量分别为对照组的 2.18倍和 2.13 倍（$P<0.05$）；处理后 48 h 时，LC_{25}，LC_{50}和 LC_{75}处理组 *hsp*70 表达量分别是对照组的1.13，1.28 和 1.40 倍（$P<0.05$）；处理后 72 h，LC_{25}和 LC_{50}处理组 *hsp*70 的表达量分别是对照组的 2.22 和 1.19 倍（$P<0.05$）(图 2：C)。

从处理的时间效应来看，LC_{25}的烯啶虫胺、毒死蜱和高效氯氰菊酯处理后，随时间延长 *hsp*70 表达量明显增加，而 LC_{50}和 LC_{75}的 3 种药剂处理后，随时间延长 *hsp*70 表达量基本呈下降趋势。

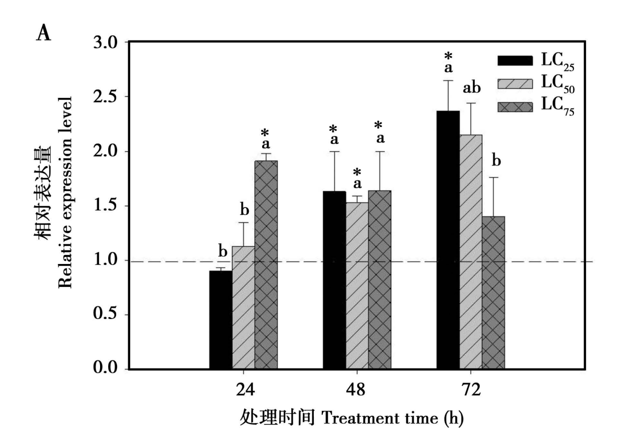
2.3　32℃下 LC_{25}和 LC_{50}的烯啶虫胺、毒死蜱和高效氯氰菊酯处理对烟粉虱地中海隐种 *hsp*70 相对表达量的影响

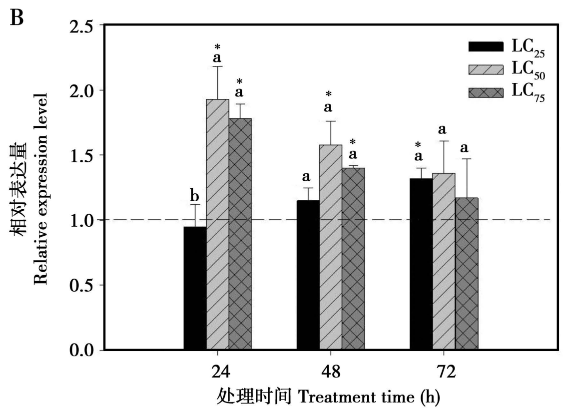
32℃下 LC_{75}的 3 种药剂处理后烟粉虱地中海隐种的死亡率几乎均为 100%，无法测定其 *hsp*70 表达量，因此只测定了 LC_{25}和 LC_{50}的 3 种药剂对烟粉虱地中海隐种 *hsp*70 表达量的影响。烯啶虫胺处理烟粉虱地中海隐种后 24 h，LC_{25} 和 LC_{50} 处理组 *hsp*70 表达量分别为对照组的 3.24 倍和 3.43 倍（$P<0.05$）；处理后 48 h，LC_{25}和 LC_{50}处理组 *hsp*70 表达量分别是相应对照组的 2.42 倍和 1.56 倍（$P<0.05$）；处理后 72 h，LC_{25} 和 LC_{50} 处理组的 *hsp*70 表达量仍然分别比相应对照组高 30% 和 50%（$P<0.05$）(图 3：A)。

毒死蜱在 32℃下处理烟粉虱地中海隐种后 24 h，LC_{25}和 LC_{50}处理组 *hsp*70 表达量分别是相应对照组的 1.99 倍和 3.84 倍（$P<0.05$）；处理后 48 h 和 72 h，LC_{50}处理组 *hsp*70 表达量分别是相应对照组的 2.04 倍和 1.69 倍（$P<0.05$）(图 3：B)。

高效氯氰菊酯处理后 24 h，LC_{25}与 LC_{50}处理组 *hsp*70 表达量分别是相应对照组的 2.31 倍和 3.71 倍（$P<0.05$）；处理后 72 h，LC_{25} 和 LC_{50} 处理组 *hsp*70 表达量分别是相应对照组的 1.50 倍和 1.43 倍（$P<0.05$）(图 3：C)。

LC_{25}的 3 种药剂处理后 24 h，*hsp*70 的相对表达量最大，随着时间延长 *hsp*70 的相对表达量逐渐下降；LC_{50}处理组 *hsp*70 的表达量同样随时间延长而下降，但到 72 h 时，仍然显著高于对照组(图 3)。





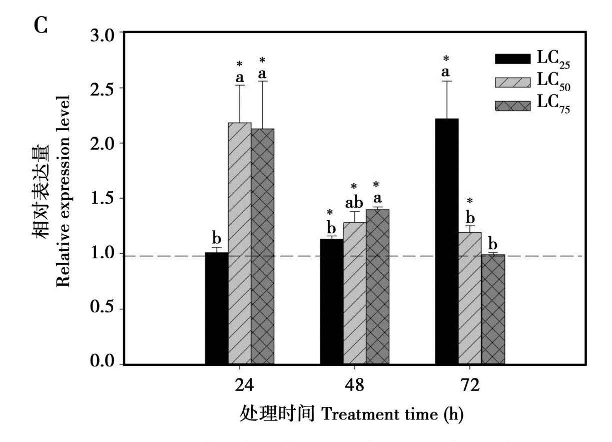
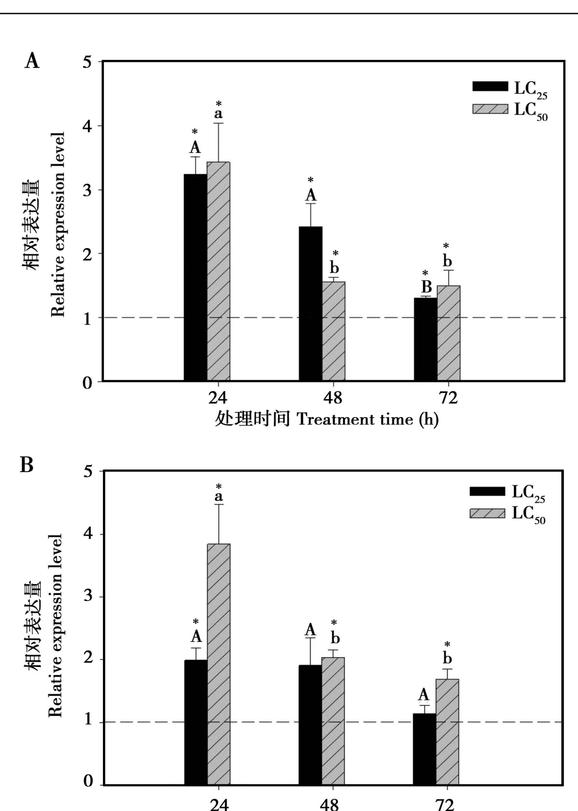


图 2　25℃下不同浓度的烯啶虫胺(A)、毒死蜱(B)和高效氯氰菊酯(C)处理烟粉虱地中海隐种不同时间后 *hsp*70 mRNA 的相对表达量

Fig. 2　Relative expression levels of *hsp*70 mRNA in *Bemisia tabaci* Mediterranean after treatment with nitenpyram (A), chlorpyrifos (B) and beta-cypermethrin (C) at LC_{25}, LC_{50} and LC_{75} for different time at 25℃

2.4　不同温度下烯啶虫胺处理不同时间后烟粉虱地中海隐种 *hsp*70 表达量的变化

在相对不利的温度（15℃ 和 32℃）条件下，LC_{25}和 LC_{50}的烯啶虫胺处理烟粉虱地中海隐种后 24 h，*hsp*70 表达量达到较高水平，此后从 48 – 72 h,其表达量呈明显下降趋势；但适宜温度(25℃)



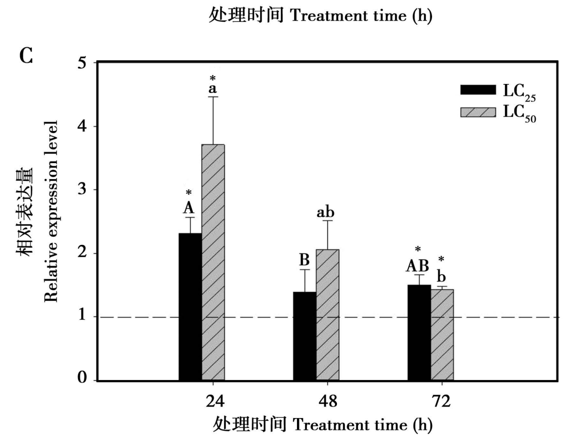
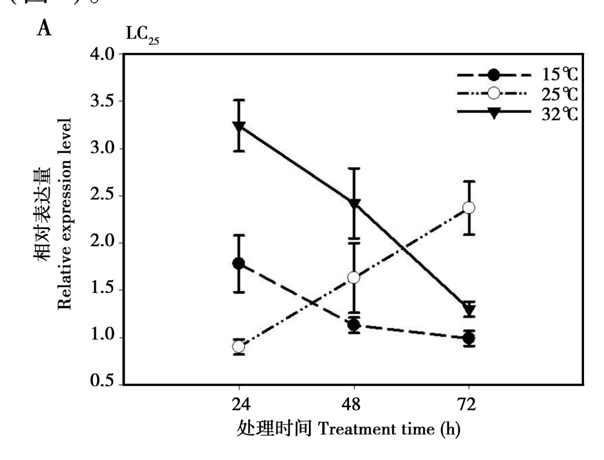


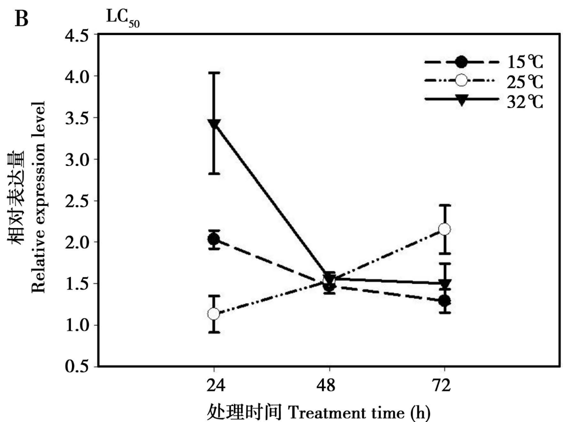
图 3　32℃下 LC_{25} 和 LC_{50} 的烯啶虫胺(A)、毒死蜱(B)和高效氯氰菊酯(C)处理烟粉虱地中海隐种不同时间后 *hsp*70 mRNA 的相对表达量

Fig. 3　Relative expression levels of *hsp*70 mRNA in *Bemisia tabaci* Mediterranean after treatment with nitenpyram (A), chlorpyrifos (B) and beta-cypermethrin (C) at LC_{25} and LC_{50} for different time at 32℃

Y = 1.0 的虚线表示对照组 *hsp*70 的表达量；不同小写和大写字母分别表示 LC_{25} 和 LC_{50} 处理不同时间组 *hsp*70 表达量差异显著(ANOVA, $P<0.05$)；星号表示该处理组与对照组存在显著差异(*t* 检验, $P<0.05$)。The expression level of *hsp*70 in control group is marked with a dash line at Y = 1.0. Bars marked with different small and capital letters mean significant difference in expression level among different treatment time after treatment with LC_{25} and LC_{50} of an insecticide, respectively (ANOVA, $P<0.05$). The asterisk indicates statistical difference between treatment and the corresponding control (*t*-test, $P<0.05$).

下处理后，随处理时间延长其表达量则由低到高呈直线上升趋势，到 72 h 时最高。但 LC_{75} 处理后，在 15℃和 25℃下 *hsp*70 的表达量均随时间延长而下降(图 4)。





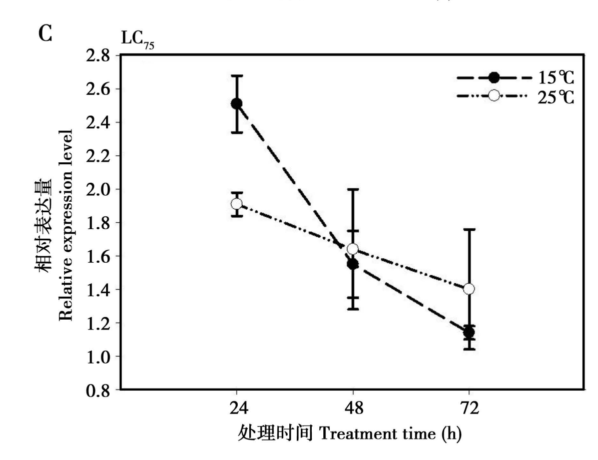


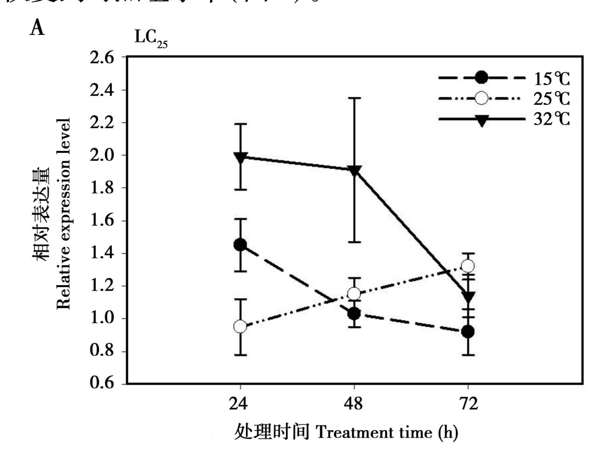
图 4　不同温度下烯啶虫胺处理不同时间后烟粉虱地中海隐种 *hsp*70 mRNA 表达量的变化

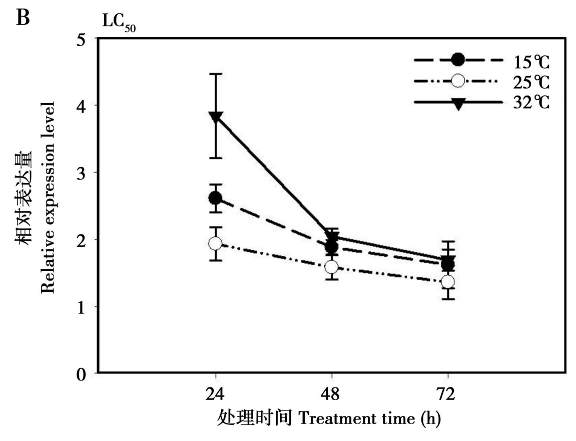
Fig. 4　Changes in the relative expression levels of *hsp*70 mRNA in *Bemisia tabaci* Mediterranean after treatment with nitenpyram for different time at different temperatures

2.5　不同温度下毒死蜱处理不同时间后烟粉虱地中海隐种 *hsp*70 表达量的变化

在 15℃和 32℃下，LC_{25} 的毒死蜱处理烟粉虱地

中海隐种 24 h，其 *hsp*70 表达量均达到较高水平，此后随时间延长其表达量呈明显下降趋势；但25℃下处理后，其表达量则随时间延长呈直线上升趋势。LC_{50}和 LC_{75}的毒死蜱处理后不同温度条件下 *hsp*70 的表达量随时间延长均明显下降，到 72 h 时恢复到对照组水平(图 5)。





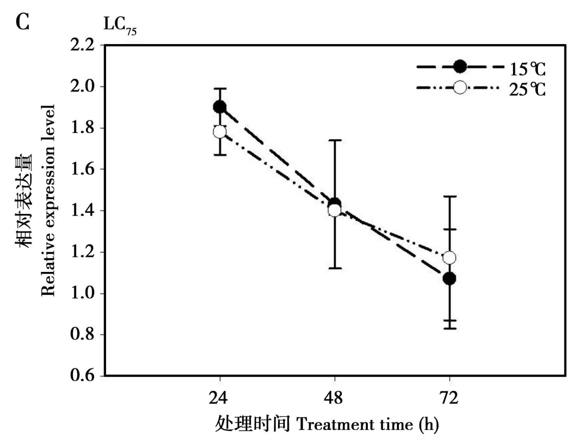


图 5　不同温度下毒死蜱处理不同时间后烟粉虱地中海隐种 *hsp*70 mRNA 表达量的变化

Fig. 5　Changes in the relative expression levels of *hsp*70 mRNA in *Bemisia tabaci* Mediterranean after treatment with chlorpyrifos for different time at different temperatures

2.6　不同温度下高效氯氰菊酯处理不同时间后烟粉虱地中海隐种 *hsp*70 mRNA 表达量的变化

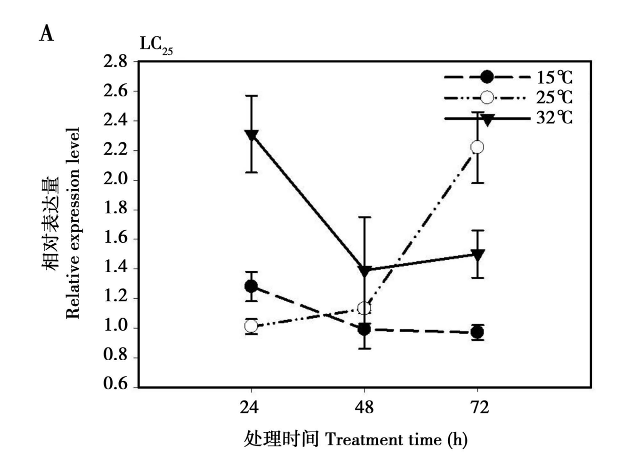
LC_{25}的高效氯氰菊酯在 15℃和 32℃下处理烟粉虱地中海隐种 24 h，其 *hsp*70 表达量达到较高水平，此后从 48 – 72 h，其表达量呈下降趋势；但25℃下处理后，其表达量随时间延长显著增加。LC_{50}和 LC_{75}的高效氯氰菊酯处理后不同温度条件下 *hsp*70 的表达量均随时间延长而下降，至 72 h 时恢复到对照水平(图 6)。

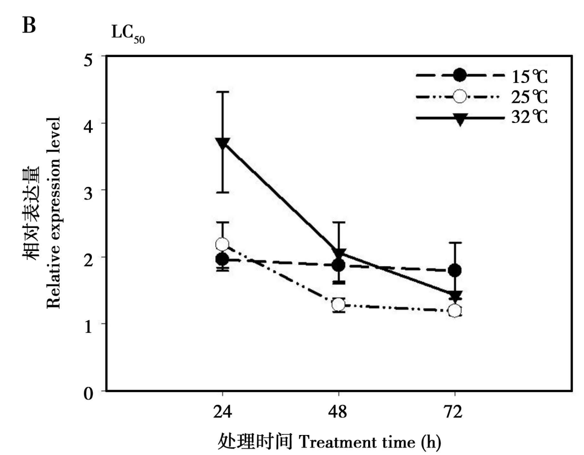
3　讨论

热激蛋白的产生是生物抵御不利环境条件的一种应激反应。几乎所有生物在遭受环境胁迫时都会迅速表达热激蛋白以保护自身免受伤害，这些胁迫因素包括病毒、细菌、真菌等生物因素及高温(或低温)、紫外线、化学农药等非生物因素(Zhao and Jones, 2012)。热激蛋白作为分子伴侣，可通过防止其他蛋白质变性，使其恢复原有的空间构象和生物活性而保护细胞，维持细胞正常的生理功能(Morimoto *et al*., 1994)。

本文较为详细地研究了烯啶虫胺、毒死蜱和高效氯氰菊酯 3 种常用于烟粉虱防治但作用机制完全不同的杀虫剂对烟粉虱地中海隐种 *hsp*70 表达量的影响。由于烟粉虱成虫活动能力较强，为便于实验操作，我们对供试烟粉虱统一进行了 –20℃，5 min 的冷冻处理。虽然极端温度对于烟粉虱热激蛋白的表达有影响，但本研究在实验时，低温处理的时间非常短，仅为 5 min，而一般研究极端温度对烟粉虱 *hsp* 表达水平的影响，至少要处理 1 h(崔旭红等，2007；王海鸿和雷仲仁，2010)；另外，本研究对所有试虫均进行 –20℃ 5 min 处理后，再分为两组分别用药剂和 TritonX-100 进行处理，即处理组和对照组试虫均经过 –20℃ 5 min 的处理，因此，该处理方式即使对 *hsp*70 的基础表达有影响，其影响对处理组和对照组也是相同的，因而不会影响后续实验中杀虫剂对 *hsp*70 诱导表达效果的检测。

本研究发现上述 3 种药剂对烟粉虱地中海隐种 *hsp*70 表达量的影响虽然不尽相同，但都可显著诱导其表达量增加。在 15℃和 25℃下，3 种杀虫药剂在浓度为 LC_{50}和 LC_{75}时的诱导效果明显高于 LC_{25}，但在 32℃下，LC_{25}和 LC_{50}的药剂对 *hsp*70 表达量的影响基本一致(图 1 ~ 3)。除 LC_{25}的 3 种杀虫药剂在 25℃下对 *hsp*70 表达量的诱导呈逐渐增加的趋势





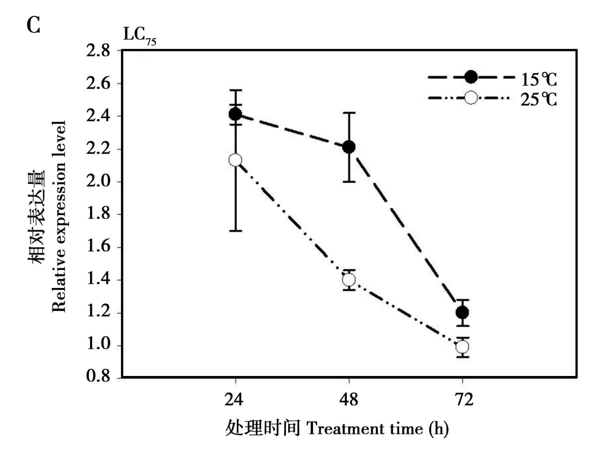


图6 不同温度下高效氯氰菊酯处理不同时间后烟粉虱地中海隐种 *hsp*70 mRNA 表达量的变化

Fig. 6 Changes in the relative expression levels of *hsp*70 mRNA in *Bemisia tabaci* Mediterranean after treatment with beta-cypermethrin for different time at different temperatures

外，LC_{50}和LC_{75}的3种药剂在相对不利的温度条件下(15℃和32℃)，对烟粉虱地中海隐种 *hsp*70 表达量的诱导均表现为短期效应，24 h 时最高，48 h 明显下降，到 72 h 基本恢复到对照水平(图4～6)。这可能因为热激蛋白的诱导表达是昆虫对环境胁迫的应激反应，是一种短期行为，如果长期大量表达热激蛋白，则会导致其他功能蛋白或结构蛋白的合成不足，反而更不利于其生存，因此在短时间升高后又逐渐恢复到正常水平。另外，LC_{25}的3种药剂在相对不利的温度(15℃和32℃)条件下处理24 h，烟粉虱 *hsp*70 的表达量均高于25℃时表达量，说明低浓度药剂处理条件下，温度变化对该基因的诱导效应要大于杀虫剂的诱导效应；而高浓度(LC_{50}和LC_{75})药剂在不同温度下处理 24 h 基本都可显著诱导烟粉虱 *hsp*70 的表达量增加，说明高浓度药剂的诱导效应比低浓度药剂要明显。综合来看，3 种杀虫药剂对烟粉虱地中海隐种 *hsp*70 表达的诱导具有明显的浓度、温度和时间效应。hsp70 在其他昆虫中同样也可以被不同类型的杀虫药剂诱导表达，如在黑腹果蝇 *Drosopila melanogaster* 中可被低浓度(0.002 mg/L)的溴氰菊酯诱导表达(Mukhopadhyay *et al*., 2002)；溴虫腈可诱导培养的甘蓝夜蛾 *Mamestra brassicae* 细胞系中 *hsp*70 的表达，且诱导表达量与时间和药剂浓度相关(Sonoda and Tsumuki, 2007)。抗蚜威处理敏感和抗性桃蚜 *Myzus persicae* 后 20 h 和 30 h，其 hsp70 表达量均显著上调(Silva *et al*., 2012)。硫丹和久效磷对铜绿蝇 *Lucilia cuprina* 离体组织中的 hsp60 和 hsp70 同样具有明显诱导作用(Sharma *et al*., 2008)。Feng 等(2010)发现阿维菌素处理可显著诱导阿维菌素抗性、耐热品系和敏感品系朱砂叶螨 *Tetranychus cinnabarinus* 的 hsp90 的过量表达，推测 hsp90 的表达可能与其对阿维菌素的抗性和对极端温度的忍耐有关。

杀虫药剂进入生物体内后除了与其主要作用靶标结合发挥其毒性外，还可引起机体其他组织的损伤。如 Bagchi 等(1995)发现倍硫磷、氯丹和异狄氏剂等杀虫药剂处理大鼠可引起其脑部脂类的过氧化及 DNA 单链断裂，这主要是药剂处理后导致机体内产生大量活性氧或氧自由基所致。而 hsp 蛋白的过量表达则可通过短期内改变细胞的代谢活性，防止蛋白降解、抑制细胞膜中脂类的过氧化、维持 ATP 水平或诱导过氧化物歧化酶表达等消除这些氧化压力，从而保护细胞免受伤害(Freeman and Meredith, 1989)。Yadav 等(2005)也认为 DDT 抗性埃及伊蚊 *Aedes aegyptia* hsp70 的高水平表达可能增强了其对高温的耐受能力。因此，我们推测，杀虫药剂诱导的 hsp70 表达量增加可能增强了烟粉虱地中海隐种对杀虫药剂和高温的耐受能力，这可能是导致其在我国快速扩张的原因之一。但要进一步

明确 hsps 过量表达与烟粉虱地中海隐种对杀虫药剂抗性(或耐受性)的关系，则需要应用毒理基因组学的理论与技术进一步深入研究。

参考文献（References）

Bagchi D, Bagchi M, Hassoun EA, Stohs SJ, 1995. *In vitro* and *in vivo* generation of reactive oxygen species, DNA damage, and lactate dehydrogenase leakage by selected pesticides. *Toxicology*, 104: 129 – 140.

Bethke JA, 2009. First record of the Q biotype of the sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci*, in Guatemala. *Phytoparasitica*, 37: 61 – 64.

Brown JK, 2007. The *Bemisia tabaci* complex: genetic and phenotypic variability drives begomovirus spread and virus diversification. *APSnet Features*. http://www.apsnet.org/publications/apsnetfeatures/Pages/BemisiatabaciComplex.aspx

Chen C, Ma J, Wang XR, Qin CH, Li JH, 2011. The identification of biotypes of *Bemisia tabaci* in Hubei Province. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 48(1): 22 – 26.［陈冲，马娟，王欣茹，覃春华，李建洪，2011. 湖北省烟粉虱生物型鉴定. 应用昆虫学报，48(1): 22 – 26］

Cui XH, Xie M, Wan FH, 2007. Changes in expression level of heat shock protein 70 gene in *Bemisia tabaci* B-biotype (Homoptera: Aleyrodidae) under high temperature stress. *Acta Entomologica Sinica*, 50(11): 1087 – 1091.［崔旭红，谢明，万方浩，2007. 高温胁迫下 B 型烟粉虱热激蛋白基因 *hsp*70 表达量的变化. 昆虫学报，50(11): 1087 – 1091］

De Barro PJ, Liu SS, Boykin LM, Dinsdale AB, 2011. *Bemisia tabaci*: a statement of species status. *Annual Review of Entomology*, 56: 1 – 19.

Feng HZ, Wang L, Liu YH, He L, Li M, Lu WC, Xue CH, 2010. Molecular characterization and expression of a heat shock protein gene (*hsp*90) from the carmine spider mite, *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval). *Journal of Insect Science*, 10: 112 – 118.

Freeman ML, Meredith MJ, 1989. Glutathione conjugation and induction of a 32,000 dalton stress protein. *Biochemical Pharmacology*, 38: 299 – 304.

Langer-Jaesrich M, Köhler HR, Gerhardt A, 2010. Assessing toxicity of the insecticide Thiacloprid on *Chironomus riparius* (Insecta: Diptera) using multiple end points. *Archives of Environment Contamination and Toxicology*, 58: 963 – 972.

Lindquist S, 1986. The heat-shock response. *Annu. Rev. Biochem.*, 55: 1151 – 1191.

Luo C, Jones CM, Devine G, Zhang F, Denholm I, Gorman K, 2010. Insecticide resistance in *Bemisia tabaci* biotype Q (Hemiptera: Aleyrodidae) from China. *Crop Protection*, 29: 429 – 434.

Mahadav A, Kontsedalov S, Czosnek H, Ghanim M, 2009. Thermotolerance and gene expression following heat stress in the whitefly *Bemisia tabaci* B and Q biotypes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 39(10): 668 – 676.

Morimoto RT, Tissieres A, Georgopoulos C, 1994. The biology of heat shock proteins and molecular chaperones. *Cold Spring Harbor Monograph Series*, 26: 496.

Mukhopadhyay I, Nazir A, Saxena DK, Chowdhuri DK, 2002. Toxicity of cypermethrin: hsp70 as a biomarker of response in transgenic *Drosophila*. *Biomarkers*, 7: 501 – 510.

Pan HP, Ge DQ, Wang SL, Wu QJ, Xu BY, Xie W, Zhang YJ, 2010. Replacement of B biotype *Bemisia tabaci* by Q biotype *B. tabaci* in some areas of Beijing and Hebei. *Plant Protection*, 36(6): 40 – 44.［潘慧鹏，戈大庆，王少丽，吴青君，徐宝云，谢文，张友军，2010. 在北京和河北局部地区 Q 型烟粉虱取代了 B 型烟粉虱. 植物保护，36(6): 40 – 44］

Parse UD, Lindquist S, 1994. Heat shock proteins and stress tolerance. In: Morimoto R, Tissieres A, Georgopeulous C eds. The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 457 – 494

Pfaffl MW, 2001. A new mathematical model for relative quantification in real time RT-PCR. *Nucl. Acids Res.*, 29(9): e45.

Sharma S, Rohilla MS, Reddyp VJ, Tiwari PK, 2008. *In vitro* induction of 60-kDa and 70-kDa heat shock proteins by endosulphan and monocrotophos in sheep blowfly *Lucilia cuprina*. *Archives of Environment Contamination and Toxicology*, 55: 57 – 69.

Shashikumar S, Rajini PS, 2010. Cypermethrin elicited responses in heat shock protein and feeding in *Caenorhabditis elegans*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73: 1057 – 1062.

Shi PX, Wang DS, Teng HY, Zhang QL, Zhang TS, Yuan YD, Wang JG, 2012. The identification of biotypes of *Bemisia tabaci* in Shanghai area. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 34(2): 276 – 281.［史苹香，王冬生，滕海媛，章巧利，张天澍，袁永达，王建国，2012. 上海地区烟粉虱生物型的鉴定. 江西农业大学学报，34(2): 276 – 281］

Silva AX, Jander G, Samaniego H, Ramsey JS, Figueroa CC, 2012. Insecticide resistance mechanisms in the green peachaphid *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) I: a transcriptomic survey. *PLoS ONE*, 7(6): e36366.

Sonoda S, Tsumuki H, 2007. Induction of heat shock protein genes by chlorfenapyr in cultured cells of the cabbage armyworm, *Mamestra brassicae*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 89: 185 – 189.

Teng X, Wan FH, Chu D, 2010. *Bemisia tabaci* biotype Q dominates other biotypes across China. *Florida Entomologist*, 93(3): 363 – 368.

Tian YA, Yang XR, Liang P, Gao XW, 2012. An improved bioassay method for adults of whiteflies. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 49(2): 556 – 561.［田玉安，杨茜茹，梁沛，高希武，2012. 一种改进的粉虱成虫生物测定方法. 应用昆虫学报，49(2): 556 – 561］

Ueda S, Brown JK, 2006. First report of the Q biotype of *Bemisia tabaci* in Japan by mitochondrial oxidase I sequence analysis. *Phytoparasitica*, 34: 405 – 411.

Wang HH, Lei ZR, 2010. Cloning and inter-specific altered expression of heat shock gene *Hsp*70 in two invasive whiteflies in response to thermal stress. *Chinese Journal of Ecology*, 29(4): 693 – 701.［王海鸿，雷仲仁，2010. 两种入侵粉虱热激基因 *Hsp*70 的克隆及温度胁迫下的种间差异表达. 生态学杂志，29(4): 693 – 701］

Yadav P, Bardep V, Gokhale MD, Vipat V, Mishra AC, Pal JK,

Mourya DT, 2005. Effect of temperature and insecticide stresses on *Aedes aegypti* larvae and their influence on the susceptibility of mosquitoes to Dengue-2 virus. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 36(5): 1139 – 1144.

Yoshimi T, Minowa K, Karouna-Renier NK, Watanabe C, Sugaya Y, Miura T, 2002. Activation of a stress-induced gene by insecticides in the midge, *Chironomus yoshimatsui*. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 16: 10 – 17.

Zhao L, Jones WA, 2012. Expression of heat shock protein genes in insect stress responses. *Invertebrate Survival Journal*, 9: 93 – 101.

（责任编辑：赵利辉）